MG Metallogenics
レドックスアッセイ

総抗酸化能(TAC:Total Antioxidant Capacity)測定キット
(商品コード: AC01D)
Ver. 1.0　　2014 年 6 月 24 日

取扱説明書

*本製品は研究用キットです。診断、治療目的には使用しないで下さい。
*下記 web 上に掲載しているプロトコールの最新版を確認の上、操作して下さい。
http://metallogenics.com/

測定原理

本キットは二価の銅イオン(Cu^{2+})を含む水溶液と一価の銅イオン(Cu^{+})に特異的に反応するキレート試液で構成されています。試料を銅(Ⅱ)水溶液に添加すると、銅(Ⅱ)は試料中の抗酸化物質により銅(Ⅰ)に還元されます。還元された銅(Ⅰ)はキレート剤（バソクプロイン）と反応し、錯体を形成します。この銅(Ⅰ)–バソクプロイン錯体の吸光度を波長 490nm で測定することにより、試料の総抗酸化能(銅還元能)を測定することができます。

測定の意義

活性酸素は DNA、細胞等を傷つけ、種々の臓器障害を惹起します。そのため生体は抗酸化物質を合成し、また外部から摂取することによって活性酸素を補足し、その傷害から生体を防御しています。抗酸化物質と活性酸素のバランスが崩れると酸化ストレスとなり、動脈硬化やアルツハイマーなど、様々な疾病の原因となります。
生体中で働く抗酸化物質には尿酸やアスコルビン酸、グルタチオンなどがあり、これらを総合的に評価する指標が総抗酸化能です。総抗酸化能は試料中の抗酸化物質が銅を還元することを利用して、試料の総抗酸化能を評価するものです。生体の総抗酸化能は酸化ストレスに対する抵抗力の指標とすることができ、血清の総抗酸化能は、高血圧等の疾病により低下することが知られています。総抗酸化能は老化や疾病のマーカーとして大きく期待されています。また、血清以外にも、ワインや果汁等、飲料、食品の総抗酸化能の測定や機能性食品の評価にもご利用いただけます。

キット内容

合計 200 測定分

①	R-A	緩衝液（キレート試液：バソクプロイン）	● (赤)	30mL
②	R-B	発色液（銅(Ⅱ)水溶液）	● (黄)	14mL
③	R-C	停止液	● (青)	6mL
④	標準試料	アスコルビン酸(凍結乾燥品：精製水溶解時 1mM)	● (緑)	バイアル 1 本

測定の注意点

- 反応時間は測定値の精度や再現性に大きく影響します。反応時間は精密に管理して下さい。(マルチチャンネルピペットの使用を推奨します)
- 血清サンプルは新鮮なもの又は-20°C 以下で保存したものを使用して下さい。
- 溶血検体は使用しないで下さい。
- 抽出試料等はあらかじめ pH2 以上に調整したものを使用して下さい。
- 試料が懸濁している場合は、遠心分離等により清澄化したものを使用して下さい。
- 測定レンジ以上の高濃度の検体は適当に希釈したものをアッセイ検体として下さい。
- 本製品は、その得られる数値を保証するものではありません。
  応用する際は最適パラメータを試料種ごとに検討の上、使用して下さい。
- 凍結乾燥を繰り返すと、試料が酸化し、負の妨害を与える可能性があります。
- 銅や銅キレートを含む試料では、正しい値が出ない可能性があります。
- EDTA は測定値へ影響を与えるため、使用しないで下さい。

必要な器具・試薬

- マイクロプレートリーダー
- マイクロプレート(96 穴ウェル)
- マイクロピペット(5μL 分注用)
- マルチチャンネルピペット(30、50、150μL 分注用)
- マルチチャンネルピペット用　リザーバー
- 精製水

操作方法

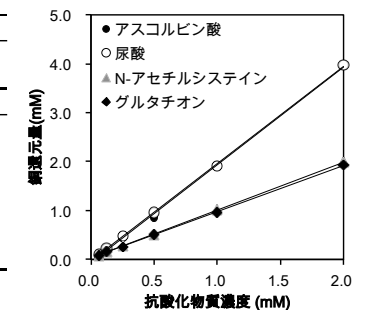
1. 試薬の準備

1.）標準試料の準備
標準試料のバイアル 1 瓶に対し精製水をラベルに表示されている量分注し、室温にて 30 分静置して溶解します。
調製された標準物質は、冷凍にて 1 ヶ月保管が可能です。ただし、凍結乾燥を繰り返さないで下さい。

2.）緩衝液・発色液・停止液は常温に戻してから使用してください。
*開封後は冷暗所（2～8℃）に保存し、1 ヶ月以内に使用して下さい。

2. 試料の調製

試料によっては測定範囲を超える場合があります。以下の表を目安に、試料を精製水あるいは生理食塩水で希釈して、アッセイに用いて下さい。
参考希釈倍率：

試料		希釈の目安	測定実施例	
			抗酸化物質濃度(アスコルビン酸相当)	銅還元能
血清・血漿		1倍	0.42mM	0.84 mM
食品	紅茶	8倍	7.59mM	15.2 mM
	コーヒー	25倍	5.93mM	11.9 mM
	赤ワイン	8倍	15.83mM	31.7 mM
	白ワイン	4倍	1.37mM	2.7 mM
	果汁飲料	4倍	1.43mM	2.9 mM
	日本酒	1倍	0.51mM	1.0 mM

※　測定値はあくまでも一例です。測定値が 3mM を超える場合は希釈が必要です。

3.測定方法

プレートリーダー（紫外可視分光光度計）による定量 (1 検体 255μL 容量)

以下の用量で精製水（または生理食塩水)、標準試料、試料、緩衝液、発色液をウエルへ分注して下さい。

○アッセイ

	添加する試薬・試料 (μL)	アッセイ検体 試薬ブランク	 標準試料	 試　料
1	精製水 or 生理食塩水	5	-	-
	標準試料	-	5	-
	試　料	-	-	5
2	緩衝液	150	150	150
	十分に混合し、室温 5 分間反応後、試薬ブランクを対照（ゼロ点）として所定波長の吸光度 OD1 を測定			
3	発色液	70	70	70
	十分に混合し、室温 5 分間反応			
4	停止液	30	30	30
	十分に混合し、試薬ブランクを対照として、所定波長の吸光度 OD2 を測定			

*ピペッティングにより泡が発生しないように丁寧に混合して下さい。泡が発生した場合はプレートミキサー等により除去してください。プレートミキサーのみによる混合、撹拌では再現性不良が発生する場合があります。
*アッセイのタイムラグは測定値に影響します。反応時間は精密に管理して下さい。
*標準液の濃度はカットオフ値、目的に合わせて、選択して下さい。但し 3.0mM 以上の試料では 2 倍～30 倍希釈したものをアッセイ検体として下さい。
*アッセイボリュームを変更する場合は上記割合でアッセイして下さい。

測定条件（マイクロプレートリーダー）

測光波長（主波長）	490 nm (吸収極大波長)
感度のある波長域	430～510 nm
測定温度	25～37℃
ウエル	96 穴ウエル

*懸濁試料の場合、主波長の吸光度から副波長の吸光度を差分した値を OD 値として濃度を算出することで、より一層の正確性を付与させることができます。
*タンパク質低吸着タイプのウエルを使用して下さい。

※濃度の算出方法(対照：試薬ブランク)

$$\frac{OD2_{試料} - OD1_{試料}}{OD2_{標準} - OD1_{標準}} = \text{アスコルビン酸相当 (mmol/L)}$$

$OD_{試料}$ ：　試料の吸光度
$OD_{標準}$ ：　標準試料の吸光度
対照　：　試薬ブランク

※銅還元能換算　アスコルビン酸 1mM＝銅 2mM

○濃度の算出例(対照としての試薬ブランクを測光データで差分する場合、例:96 ウェルリーダー)

	OD1	OD2	OD (OD2−OD1)	ΔOD (ODブランク−OD試料)	アスコルビン酸相当 (mM)
ブランク	0.029	0.041	0.012	−	−
標準試料	0.031	0.302	0.271	0.259	−
血清試料	0.070	0.174	0.104	0.092	0.355

主な仕様と性能

アッセイ数	200 検体
検出方法	呈色
測定範囲	0.05mM~3.0mM（アスコルビン酸相当）
感度	試薬ブランクを対象として標準試料(アスコルビン酸　1mM)を測定したときの吸光度は、0.2~0.4 の範囲内です。
同時再現性	同一検体を 5 回測定したときの CV は 5%以内です。

品質保持期限と保存方法

本品の品質保持期限は製造後 12 ヶ月です。(冷蔵 2～8℃)
開封後、冷暗所（2～8℃）で保存し、1 ヶ月以内に使用して下さい。

参考文献

1.) Campos C, Guzmán R, López-Fernández E, Casado A. Anal Biochem. “Evaluation of the copper(II) reduction assay using bathocuproinedisulfonic acid disodium salt for the total antioxidant capacity assessment: the CUPRAC-BCS assay.” *2009 Sep 1;392(1):37-44. doi: 10.1016/j.ab.2009.05.024. Epub 2009 May 21.*
2.) Yuji Naito, Masaichi-Chang-il Lee, Yoji Kato, Ryoji Nagano, Yoshikazu Yonei “Oxidative Stress Markers.” *Anti-Aging Medicine 7(5):36-44,2010*

製造販売業者

メタロジェニクス 株式会社
千葉市中央区亥鼻 1-8-15　千葉大亥鼻イノベーションプラザ

問い合わせ先

メタロジェニクス株式会社　営業部
〒260-0856　千葉市中央区亥鼻 1-8-15　千葉大亥鼻イノベーションプラザ
TEL：　043-227-6767
FAX：　043-227-6768
e-mail：　sales@metallogenics.com
URL:　http://metallogenics.com/

※ 取扱説明書、測定プロトコール等、製品に関する最新の情報は、下記弊社 website のサポートコーナーで御確認下さい。
http://metallogenics.com/
※ 本製品は研究用であり、その数値を完全に保証するものではございません。あらかじめご了承下さい。
※ 表記性能は汎用されているマイクロプレートリーダー、紫外可視分光光度計を用いた場合の目安です。使用機器の型式によっては完全に一致しない場合があります。あらかじめご了承下さい。
※ 品質に関してのお問い合わせの際は、試薬キット包装袋に貼付の Lot No.を御確認の上、お問い合わせ下さい。
※ 商品の仕様・サービス・包装形態・梱包形態・測定プロトコールは、予告なく変更する場合があります。本取扱説明書に従い、適切に御使用下さい。
※ 商品の輸送・取扱い・処理・廃棄については、付属の製品安全データシート（MSDS）に従って下さい。